

Avaliação do desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh e MGIT™ para isolamento de micobactérias

Performance evaluation of Ogawa-Kudoh and MGIT™ culture media for the isolation of mycobacteria

Heloisa da Silveira Paro Pedro¹; Susilene Maria Tonelli Nardi¹; Máira Gazzola Arroyo¹; Maria Izabel Pereira Ferreira¹; Maria do Rosário Assad Goloni¹; Lucilaine Ferrazoli^{II}

¹Centro de Laboratórios Regionais. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São José do Rio Preto, SP, Brasil

^{II}Centro de Laboratórios. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A cultura de micobactérias é de fundamental importância no diagnóstico da tuberculose, pois apresenta maior sensibilidade que a baciloscopia. Este estudo teve como objetivo verificar o desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh (OK) e *mycobacteria growth indicator tube* (MGIT™ – Becton & Dickinson) manual em relação à positividade, a rapidez do resultado, a contaminação e o acréscimo da cultura no diagnóstico em um laboratório de saúde pública no interior paulista. As amostras de pacientes com suspeita de tuberculose foram processadas duplamente para cultura: uma pelo método clássico do swab e semeadas em meio de OK e outra pelo método de Petroff e semeadas em meio líquido MGIT. Das 490 culturas realizadas, 45 (9,2%) foram positivas no meio OK e 58 (11,8%) no MGIT. O percentual de contaminação do meio OK foi 1,2% e 0,2% no MGIT. O acréscimo ao diagnóstico pela cultura no OK foi de 11 (17,7%) e no MGIT de 20 (28,2%). O crescimento em meio MGIT foi mais rápido que o OK nos resultados positivos (valor-p=0,02). A concordância/confiabilidade dos resultados foi de 95,2% (n=483). Dos 64 isolados obtidos pelo OK ou MGIT, a identificação foi realizada em 45 (70,3%): 37 (57,8%) foram identificados como *Mycobacterium tuberculosis*, 4 (6,3%) *M.intraellulare/M.chimaera*, 2 (3,1%) *M. abscessus* e 2 (3,1%) *M.avium*. O meio de MGIT apresentou melhores resultados em relação ao percentual de positividade, à rapidez no diagnóstico, à taxa de contaminação e ao acréscimo do diagnóstico da cultura, quando comparado com o meio OK.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium*. MGIT. Ogawa-Kudoh. Diagnóstico. Tuberculose. Técnicas. Procedimentos de laboratório.

ABSTRACT

Mycobacteria culture is of fundamental importance to the diagnosis of tuberculosis because presents sensitivity higher than the acid-fast smear. The purpose of this study is to evaluate the performance of the culture media Ogawa-Kudoh (OK) and manual Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT-Becton & Dickinson) in relation the positivity, speed of the results, contamination and the increase of the diagnosis by the culture in a public health laboratory in São Paulo state. The samples from patients with suspected tuberculosis were doubly processed for the culture: one by the conventional method of swab and inoculated onto OK medium, and another by the Petroff's method and inoculated in MGIT liquid medium. Of these 490 cultures performed, 45 (9.2%) were positive in the OK medium and 58 (11.8%) in MGIT. The percentage of the contamination in OK medium was 6 (1.2%) and 1 (0.2%) in MGIT. The increase of the diagnosis by the culture in OK was 11 (17.7%) and in MGIT was 20 (28.2%). The growth in MGIT medium was faster than OK in the positive results (value- $p=0.02$). The agreement/reliability of the results was 95.2% (n=483). Of these 64 isolates obtained by OK or MGIT, the identification was performed in 45 (70.3%): 37 (57.8%) were identified as *Mycobacterium tuberculosis*, 4 (6.3%) *M. intraellulare*/*M. chimaera*, 2 (3.1%) *M. abscessus* and 2 (3.1%) *M. avium*. The MGIT medium showed better results than OK medium in relation of the positivity, the rapidity of the diagnosis, rates of contamination and in the increase of the diagnosis by the culture.

KEY WORDS: *Mycobacterium*. Culture media. Diagnosis. Tuberculosis. Laboratory techniques procedures.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) representa um grande desafio em várias regiões do mundo. A taxa de incidência global da doença está aumentando cerca de 0,4% ao ano. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e aproximadamente 95% dos casos e 98% dos óbitos por TB ocorram em países em desenvolvimento.¹

A TB multirresistente e o aumento de doenças causadas por outras espécies de micobactérias (MNTs) impuseram a necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos.² A pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) é o método para diagnóstico da doença mais utilizado no Brasil, por trata-se de procedimento rápido e barato. No entanto, apresenta

baixa sensibilidade. A cultura para micobactérias é considerada o método padrão ouro para o diagnóstico da TB, apresentando positividade nos espécimes que contenham de 10 a 100 bacilos viáveis.³ A cultura de escarro também apresenta a vantagem de recuperar micobactérias para a identificação e testes de sensibilidade.⁴ Quando realizada no escarro, em geral, pode acrescentar 20% de casos ao total daqueles de TB pulmonar não confirmados pela baciloscopia.⁵

O cultivo de micobactérias pelo método swab e semeados em meio de Ogawa-Kudoh (OK) é um procedimento simples, de baixo custo e, em termos de biossegurança, apresenta menor risco para os profissionais de laboratório, uma vez que não utiliza a centrifugação. Além disso, é suficientemente sensível para confirmar o diagnóstico da TB pulmonar, nos casos suspeitos com baciloscopia negativa, e útil para recuperar os bacilos de escarros de pacientes bacilíferos que requerem teste de sensibilidade às drogas.^{6,7,5}

Outro meio, o tubo indicador de crescimento de micobactérias (MGIT), sistema da Becton-Dickinson, foi introduzido há uma década para acelerar o isolamento de micobactérias. Esse meio é composto de meio líquido Middlebrook 7H9 e uma base de silicone impregnada de rutênio. Esse composto é sensível à presença do oxigênio no meio, tendo as emissões de fluorescência reduzidas, não podendo ser detectada. Assim que os microrganismos passam a consumir o oxigênio do meio a fluorescência passa a ser detectada, podendo ser visualizada utilizando-se uma luz UV de 365nm. Desse modo, o nível de fluorescência que o tubo emite corresponde à quantidade

de oxigênio consumido por organismos no tubo.⁸

O objetivo deste estudo foi verificar o desempenho dos meios de cultura OK e MGIT manual em relação à positividade, a rapidez do resultado, contaminação e acréscimo da cultura no diagnóstico em um laboratório de saúde pública no interior paulista.

METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto – órgão vinculado à Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP). Durante cinco meses, entre 2009 e 2010, as amostras de escarro que continham volume suficiente foram duplamente processadas pelo método do swab e semeadas em meio de OK e pelo método de Petroff e semeadas em meio líquido MGIT, de acordo com instrução do fabricante.⁵

As culturas em meio de OK foram descontaminadas, a partir um swab impregnado com amostra de escarro. O swab impregnado foi colocado em tubo estéril contendo 3 ml de solução de NaOH a 4%, por dois minutos, e depois semeado com movimentos rotatórios em meio OK. As culturas foram incubadas a 37°C por até 60 dias.⁵

Para cultura em meio líquido MGIT o escarro foi semeado após descontaminação pelo método de Petroff modificado. Um volume aproximado de 2 ml de escarro foi descontaminado com igual volume de solução de NaOH 4%, contendo solução indicadora de vermelho fenol (40 gramas de NaOH, 10 ml da solução de vermelho de

fenol, 1.000 ml de água destilada esterilizada); solução estéril de vermelho fenol (0,1g de vermelho fenol, 25ml de água destilada). Os tubos contendo as amostras foram colocados durante 15 minutos em estufa bacteriológica 36°C+/-1°C e depois centrifugados por 15 minutos a 3.000g. Ao sedimentou acrescentou-se HCl 1% até viragem para a cor amarela. Em seguida, adicionou-se a solução neutralizante estéril (4 gramas de NaOH, 0,004g de vermelho fenol, 0,4g de sulfato de alumínio e potássio, água destilada 1.000ml) até a viragem para cor rosa. Uma alíquota de 0,5ml foi semeada em meio MGIT. Os tubos foram então colocados em estufa bacteriológica 36°C+/-1°C.

A leitura das culturas foi realizada semanalmente no meio OK e diariamente no meio MGIT, e o resultado negativo emitido em 60 e 42 dias, respectivamente. Registrou-se o tempo de obtenção dos resultados positivos e a presença de contaminação.

As culturas positivas foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico (morfologia e coloração das colônias) e microscópicos, após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. As culturas sugestivas de *M.tuberculosis* e MNTs⁵ foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz Central – São Paulo para investigação do perfil da sensibilidade às drogas e identificação da espécie. O teste de sensibilidade às drogas foi feito pelo método automatizado

Bactec MGIT960 (Becton & Dickinson-BD), conforme instrução do fabricante, para as quatro drogas: isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol. O teste da pirazinamida foi realizado pelo método da pirazinamidase.⁹ A identificação da espécie foi realizada pelo método de PRA-*hsp65*.¹⁰ Os resultados foram inseridos em planilha Excel e analisados pelo programa EPI INFO versão 3.5.1. e BioStat 5.0.

Para comparar variáveis dependentes (positividade, contaminação e rapidez dos testes) utilizou-se o teste do qui-quadrado e Mann-Whitney, conforme apropriado. Adotou-se como valor significativo valor-p <0,05 e poder de 80%. A análise de concordância entre métodos foi realizada pelo teste de Kappa, de acordo com proposto por Landis & Koch.¹¹ O acréscimo da cultura foi realizado de acordo com *Manual de Tuberculose e outras Micobacterioses 2008*.⁵

RESULTADOS

No período estudado, foram realizadas 490 culturas e comparado o desempenho dos dois métodos de cultura em relação à positividade, ao tempo de detecção e à contaminação. O método de MGIT manual apresentou melhor desempenho (percentual e média) em termos de positividade, rapidez e taxas de contaminação (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre os meios MGIT e Ogawa-Kudoh em relação à positividade, contaminação e rapidez do resultado.

	MGIT (n=490)	Ogawa-Kudoh (n=490)	p
Resultados positivos*	58 (11,8%)	45 (9,2%)	0,028*
Contaminação	1 (0,2%)	6 (1,2%)	
Rapidez do resultado (mediana em dias)	11 (min 2 – max 42) IC=(10,8-16,5)	21 (min 7 – max 46) IC=(19,4-27,1)	0,53**

*teste qui-quadrado

**Mann-Whitney

IC = intervalo de confiança 95%

A concordância/confiabilidade dos resultados foi de 95,2% (n=483) e o acréscimo ao diagnóstico pela cultura no OK foi de 17,7% (n=11) e no MGIT de 28,2% (n=20). Do total de culturas realizadas, 64 foram positivas ao menos em um dos dois métodos (OK ou MGIT). A identificação foi possível de ser realizada em 45 (70,3%) isolados e em 19 isolados foi confirmado somente o gênero (*Mycobacterium* spp.). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

O teste de sensibilidade foi realizado em todos os isolados de *M.tuberculosis*, e todos foram sensíveis para as drogas: estreptomicina, rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida.

DISCUSSÃO

A cultura para o *M.tuberculosis* é considerada o método padrão ouro para o diagnóstico da tuberculose e permite a recuperação da micobactéria para a identificação e teste de sensibilidade.⁴ A associação da cultura à baciloscopia permite maior cobertura no diagnóstico laboratorial da TB, além de possibilitar o isolamento do bacilo para a identificação das espécies e o estudo do perfil de susceptibilidade às drogas, visando adotar medidas de controle da doença.^{12,3} De acordo com KUDOH, a cultura por esse método aumenta o rendimento

diagnóstico em 20-40%.¹³ Em nosso estudo, a cultura em meio de OK acrescentou 17,7% ao diagnóstico, percentual um pouco abaixo do indicado pelo autor. Por outro lado, o meio de MGIT, proporcionou um acréscimo maior ao diagnóstico (28,2%).

A comparação entre as culturas semeadas nos meios de OK e MGIT revelou que, além da positividade das culturas ser maior no meio líquido MGIT (11,8%), o tempo de detecção foi bem menor (média 11 dias), proporcionando um diagnóstico mais rápido. Essa redução se deve principalmente ao fato de que o meio líquido é mais rico em nutrientes, proporcionando melhores condições de multiplicação para micobactérias.¹⁴

Dados semelhantes foram encontrados por outros autores,^{15,2,14} que constataram menor tempo de detecção, com uma média que variou de 10,5 a 12 dias. OPLUSTIL e colaboradores demonstraram que a maioria dos resultados das culturas positivas do meio MGIT foi detectada na segunda semana 78 (54,2%), seguida da primeira semana 53 (36,8%).¹⁶ O presente estudo também encontrou maior número de culturas positivas na segunda semana 14 (34,14%), enquanto na primeira semana esse percentual foi de 12 (29,26%), dados não mostrados.

Tabela 2. Espécies identificadas das culturas positivas pelos métodos MGIT e Ogawa-Kudoh.

Espécies identificadas N=45	MGIT e OK (n=27)	Somente MGIT (n=14)	Somente Ogawa-Kudoh (n=4)
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>M. tuberculosis</i> (n=37)	24 (64,8)	11*(29,7)	2 (5,4)
<i>M. avium</i> (n=2)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
<i>M. intraellulare/M. chimaerae</i> (n=4)	3 (75)	0	1 (25)
<i>M. abscessus</i> (n=2)	0	1 (50)	1 (50)

Kappa=0,63; valor-p<0,01

*2 culturas contaminaram no OK

Não foram encontrados estudos comparando o método MGIT com OK. Por outro lado, muitos trabalhos compararam a cultura em meio MGIT com cultura em meio de Lowenstein Jensen (LJ). DELURCE constatou que a cultura em meio líquido apresentou maior positividade (23%) quando comparado com meio LJ (19,2%).¹⁷ De acordo com FADZILAH, 101 (19,8%) culturas foram positivas no MGIT, enquanto 60 (11,7%) pelo LJ.⁸ MACHADO encontrou maior positividade no MGIT (15,6%) quando comparado com o meio LJ (14,1%), e a média do tempo de detecção do MGIT foi 11,43 dias e do LJ foi de 20,29 dias.¹⁵ No estudo de OPLUSTIL, das 149 amostras com pesquisa positiva, 144 amostras foram positivas no MGIT e 131 no LJ, sendo que no meio MGIT a maioria das culturas foi positiva nas duas primeiras semanas e no LJ, após 15 dias.¹⁶ PALACI e colaboradores também verificaram que as culturas positivas no MGIT foram detectadas uma semana antes das culturas positivas no LJ.¹⁸

Neste estudo foi observado melhor rendimento de culturas positivas pelo método MGIT manual. No entanto, em 4 (6,0%) amostras houve crescimento somente em meio de Ogawa Kudoh. CHIEN, em estudo comparativo entre os meios MGIT e LJ, também encontrou em 5,6% dos casos, isolamento somente no meio de LJ.¹⁹ Alguns fatores podem influenciar o resultado da cultura, como o número de organismos presentes e os métodos de colheita da amostra, tratamentos anteriores e método de processamento. Além disso, as soluções utilizadas para a digestão/descontaminação da amostra podem causar dano às micobactérias. Com a necessidade de obter diagnóstico mais rápido e isolados para teste de

sensibilidade às drogas e dados epidemiológicos, os meios líquidos são recomendados para atender à demanda e urgência dos resultados laboratoriais.^{20,14} Por essa razão, em condições ideais deve-se semear a amostra tanto em meio líquido como em meio sólido à base de ovos.

A porcentagem de concordância/confiabilidade e sensibilidade entre os meios foi alta, 95,2% e 89%, respectivamente. No entanto, a taxa de contaminação foi maior no meio Ogawa (1,2%) do que no MGIT (0,2%). Nossos resultados diferem dos encontrados na literatura²¹ e ainda é menor que os estudos realizados pelo fabricante (9,7%).

Todos os isolados de *M.tuberculosis* foram analisados quanto ao perfil de sensibilidade às drogas e todas foram sensíveis para os antibióticos: estreptomina, rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida.

As espécies de micobactérias não tuberculosas (MNT) isoladas no período foram *M.intraellulare/M.chimaera* (6,3%), *M.abcessus* (3,1%) e *M. avium* (3,1%). Essa frequência está de acordo com estudos anteriores realizados nessa mesma região.^{22,23} Vale destacar que a espécie *M.avium* cresceu somente no meio MGIT, e um isolado de *M.abcessus* somente no meio de Ogawa-Kudoh.

Por fim, ressalta-se a importância de estudos sobre comparação e o conhecimento do perfil da TB e micobacterioses em nossa área de abrangência e da eficácia e rapidez na detecção de micobactérias, pois possibilitarão a divulgação e comparação dos resultados com outras regiões do País e, principalmente, o diagnóstico precoce da tuberculose e micobacterioses.

CONCLUSÃO

O meio de cultura MGIT apresentou melhores resultados em relação ao percentual de positividade, rapidez no diagnóstico, taxa de contaminação e acréscimo do diagnóstico da cultura, quando comparado ao meio OK. Dessa forma, o meio MGIT melhorou o diag-

nóstico das infecções por micobactérias, em razão do meio líquido ser mais sensível que o meio sólido.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à bibliotecária Rosângela Maria Moreira Kavanami pela correção das referências.

REFERÊNCIAS

1. Brito RC, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Cavalcanti HR, Pereira MM, et al. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. J Bras Pneumol. 2004;30(4):425-32.
2. Oplustil CP, Teixeira SR, Osugui SK, Mendes CF. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. J Bras Patol Med Lab. 2002;38(3):167-73.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de bacteriologia da tuberculose. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Rio de Janeiro; 1994.
4. Brodie D, Schluger NW. The diagnosis of tuberculosis. Clin Chest Med. 2005;26(2):247-71.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobacterioses [monografia na internet]. Brasília, 2008 [acesso em 2011 fev 9]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil [monografia na internet]. Brasília, 2010 [acesso em 2010 nov 9]. Disponível em: http://www.crf-rj.org.br/crf/arquivos/Manual_Recomendacoes_Controlo_TB.pdf.
7. Ribeiro FH, Dantas MCS, Maia R, Lecco R, Luchi BMM, Bussular JL, et al. Comparação do método de Ogawa Kudoh com os métodos de Lauril sulfato de sódio e fosfato trisódico para cultivo de micobactérias [periódico na internet]. [acesso em 2010 set 24]. Disponível em: http://www.jornaldepneumologia.com.br/portugues/suplementos_detalhe.asp?id_cap=64.

8. Fadzilah MN, Kee Peng NG, Yun Fong N. The manual MGIT system for the detection of *M.tuberculosis* in respiratory specimens: an experience in the University Malaya Medical Centre. *J Pathol.* 2009;31(2):93-7.
9. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Identification of species. In: *Tuberculosis bacteriology: organization and practice.* 2. ed. Butterworth- Heinemann, Oxford, 1997.
10. Chimara E, Ferrazoli L, Ueki SYM, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol.* 2008;8:48.
11. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-74.
12. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Jardim S, Souza VC. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na cidade do Rio Grande, RS, Brasil. *Rev Bras Anal Clin.* 2003;35(1):35-8.
13. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ.* 1974;51(1):71-82.
14. Almeida EA, Santos MAA, Afiune JB, Spada DTA, Melo FAF. Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema de diagnóstico automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2005;31(3):231-6.
15. Machado AMO. Avaliação do meio de cultura líquido BBL mycobacteria growth indicator tube (MGIT) em rotina de detecção de micobactérias em amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 1998.
16. Oplustil CP, Sinto SI, Martins M, Mendes CMF. Avaliação de um novo sistema para detecção de micobactérias: "mycobacterium growth indicator tube" (MIGIT). *J Bras Patol.* 1997;33(2):70-5.
17. Delurce TAE. Detecção de bactérias do complexo *M.tuberculosis* em saliva/muco ou escarro em centro de referência ambulatorial para tuberculose na cidade de São Paulo: baciloscopia, cultura convencional e automatizada [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
18. Palaci M, Ueki SYM, Sato DN, Telles MAS, Curcio M, Silva EAM. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 1996;34(3):762-4.
19. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the Bactec MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int j tuberc lung dis.* 2000;4(9):866-70.
20. Kritski ALL, Rufino-Neto A. Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(7):622-6.
21. López LM, Vélez CI, Zuluaga LM, Mejía GI, Estrada S, Posada P, et al. Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. *Infectio.* 2001;5(4):235-40.

22. Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Ueki SYM, Chimara E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. J Bras Pneumol. 2008;34(11):950-5.
23. Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Pires FC, Oliveira RS, Rocha MAB, et al.

Mycobacterium tuberculosis in a HIV-I-infected population from Southeastern Brazil in the HAART era. Trop Med Int Health. 2011;16(1):67-73.

Recebido em: 01/03/2011
Aprovado em: 30/06/2011

Correspondência/correspondence to:

Heloisa da Silveira Paro Pedro
Rua Alberto Sufredini Bertoni, nº 2.325 – Maceno
CEP: 15060-020 – São José do Rio Preto/SP – Brasil
Fone: 55 17 3224-2602, ramal 29
E-mail: hspedro@ial.sp.gov.br